

**Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens**

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung  
5 doppelsträngiger Oligoribonukleotide.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-  
10 Sinn-RNA handelt es sich um ein RNA-Molekül das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbesondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen oder viralen  
15 Infektionen, eingesetzt werden. - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

20 Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlgepaarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel  
25 enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelstränge gehen zufällige Basenpaarungen miteinander ein, so dass fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur  
30 Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Das Genom von Retroviren besteht aus doppelsträngiger RNA, die während der Vermehrung des Retrovirus verschiedene Proteine bindet. Die Bindung dieser Proteine und damit die Vermehrung des Virus

kann gehemmt werden, wenn unspezifische dsRNA in hohen Konzentrationen in die infizierten Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Konkurrenz der unspezifischen dsRNA mit der doppelsträngigen Virus-RNA. Der hemmende Effekt bzw.

5 die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

Aus Fire, A. et.al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, dass dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die 10 Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, dass die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA zurückzuführen ist. - 15 Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach 20 dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst wirksames Medikament bzw. eine möglichst wirksame Verwendung zur Herstellung eines Medikaments angegeben werden, mit dem/der eine Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens bewirkbar ist.

25

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 13 und 14 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 3 bis 12 und 15 bis 26.

30 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu

- diesem Gen ist. - Es hat sich überraschend gezeigt, dass dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in humanen Zellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.
- Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Sofern dsRNA als Wirkstoff benutzt wird, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dass die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare auf. Eine solche dsRNA bzw. ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

Das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, kann in eukaryontischen Zellen oder in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar sein. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder 5 Viroids sein. - Das vorgeschlagene Medikament erlaubt die Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs und viraler Erkrankungen.

Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder 10 planzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfindungsgemäße Medikament auch die Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA 15 abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Ihre Enden können zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sein. Dadurch wird ein enzymatischer Angriff erschwert.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung 20 doppelsträngiger Oligoribonukleotide zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Überraschenderweise eignet sich dsRNA zur Herstellung eines 25 Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die 30 Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide

(dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist. - Die Verwendung eines Vektors ermöglicht die 5 Herstellung besonders preisgünstiger und wirksamer Medikamente.

Hinsichtlich der verwendungsgemäßen Ausgestaltungen wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

10

Ausführungsbeispiel:

Mittels herkömmlicher Verfahren ist ein aus dem einzigen Sequenzprotokoll ersichtlicher RNA-Einzelstrang enzymatisch 15 synthetisiert worden.

Ferner ist der dazu komplementäre RNA-Einzelstrang synthetisiert worden. Anschließend sind der Einzelstrang und der dazu komplementäre Einzelstrang zur dsRNA vereinigt 20 worden. Die so hergestellte dsRNA enthält einen Abschnitt des "immediate early gene" des Cytomegalievirus.

Versuchsprotokoll:

Es wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, unter dessen 25 Verwendung die benötigte dsRNA hergestellt werden konnte. Für die Konstruktion dieses T7/SP6-Transkriptionsplasmides wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der 363 Basenpaare vom 5'-Ende des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus durchgeführt. Als Matrize diente käuflich 30 erwerbliche "positive control DNA" aus dem Cytomegalievirus des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega. Als Primer dienten Oligodesoxyribonukleotide, deren Sequenz identisch mit bzw.

komplementär zu den Enden des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's" waren. Als Klonierungsvektor für das erhaltene PCR-Produkt diente der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T (Fa. Promega). Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue.

- 5 Plasmid-DNA eines ausgewählten Klons, deren Sequenz durch partielle Sequenzierung überprüft worden war, wurde mit *Nco*I bzw. *Sal*I linearisiert und als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet (RiboMAX<sup>TM</sup> *in vitro*-Transkriptionskit, Fa. Promega).

10

Die erhaltenen Oligoribonukleotide wurden gereinigt und in Natriumphosphatpuffer (pH 6,5) in Gegenwart von 100 mM NaCl in äquimolaren Mengen zusammengegeben. Nach kurzem Erhitzen auf 95°C wurde die Mischung über einen Zeitraum von ca. 2,5 15 Stunden langsam abgekühlt, wodurch die Bildung von dsRNA durch Paarung der beiden komplementären Einzelstränge erreicht wurde.

Testsystem mit menschlichem Zellkerneextrakt:

- 20 Unter Verwendung des HeLaScribe<sup>®</sup> Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit's der Fa. Promega wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen Bereichs des "immediate early gene's" des Cytomegalievirus in Gegenwart der beiden einzelsträngigen Oligoribonukleotide sowie der 25 dsRNA bestimmt. Dies erfolgte anhand der in die "run off"-Transkripte inkorporierten Radioaktivität des als Substrat verwendeten [ $\alpha^{32}$ P] ATP. Die Trennung des freien ATP vom entstandenen Transkript wurde mittels Gelelektrophorese vorgenommen. Die Auswertung des Gels erfolgte mit Hilfe eines 30 Radioaktivitätsdetektors (Instant-Imager).

Ergebnis und Schlussfolgerung:

Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne RNA sowie auch zu den Ansätzen mit einzelsträngiger RNA. Die Wirksamkeit der dsRNA war schon bei 5 Zugabe von geringen Mengen, nämlich weniger als 10% der bei der Antisinn-Technologie zur Hemmung der Translation erforderlichen RNA-Konzentration, zu erreichen. Der hemmende Effekt einzelsträngiger Antisinn-RNA wäre in diesem Testsystem nicht nachzuweisen, da hierbei die Inhibition auf 10 der Ebene der Translation stattfindet. Hier wurde die Transkription untersucht. Die hiermit erstmals beim Menschen beobachtete Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA zeigt deutlich eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf 15 einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

**Patentansprüche**

1. Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.  
5
2. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.  
10
3. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.  
15
4. Medikament nach Anspruch 1, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.  
20
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare aufweist.  
25
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.  
30

7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
- 5 8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
9. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus ein  
10 humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
10. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.  
15
11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 20 12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.
13. Verwendung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA)  
25 zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.
- 30 14. Verwendung eines Vektors zur Kodierung doppelsträngiger Oligoribonukleotide (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines

vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

15. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA verpackt  
5 in micellaren Strukturen, vorzugsweise in Liposomen,  
vorliegt.
16. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die dsRNA in virale  
natürliche Kapside oder in auf chemischem oder  
10 enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder  
davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei  
dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 250 bis 350, Basenpaare  
15 aufweist.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei  
das zu hemmende Gen, vorzugsweise ein Onkogen, in  
eukaryontischen Zellen exprimiert wird.  
20
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei  
das zu hemmende Gen in pathogenen Organismen,  
vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
- 25 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei  
das zu hemmende Gen Bestandteil eines Virus oder  
Viroids ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus ein  
30 humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

22. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 5 23. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 10 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei die Enden der dsRNA zur Verhinderung eines Abbaus in der Zelle modifiziert sind.
- 15 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapiierenden Organismus injizierbar ist.
26. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 25, wobei die dsRNA bzw. der sie kodierende Vektor in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen sind.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament mit mindestens einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens, wobei ein Strang der dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu diesem Gen ist.

**Medicament to inhibit the expression of a given gene**

The invention concerns a medicament and a use of double-stranded oligoribonucleotides.

5

DE 196 31 919 C2 describes an antisense RNA with particular secondary structures, whereby the antisense RNA is present in the form of a vector that codes for it. This antisense RNA concerns an RNA molecule that is complementary to regions of 10 the mRNA. Inhibition of gene expression is effected by binding to these regions. This inhibition can be used, in particular, for the diagnosis and/or treatment of diseases, such as tumor diseases or viral infections. Unfortunately, the antisense RNA must be introduced into the cell in a 15 quantity that is at least as great as the quantity of mRNA. The effectiveness of the known antisense method is not particularly high.

A medicament is known from US 5,712,257 that contains the 20 mispaired double-stranded RNA (dsRNA) and biologically active mispaired fragments of dsRNA in the form of a ternary complex having an agent that is surface-active. The dsRNA used for this consists of synthetically produced single nucleic acid strands without a defined base sequence. The single strands 25 combine into chance base pairings such that mispaired double strands are formed. The known dsRNA is used to inhibit the reproduction of retroviruses such as HIV. The retrovirus genome consists of double-stranded RNA that binds various proteins during reproduction of the retrovirus. The binding 30 of these proteins, and thus the reproduction of the virus,

can be inhibited if non-specific dsRNA is introduced in high concentrations into the infected cells. This leads to competition between the non-specific dsRNA and the double-stranded viral RNA. The inhibitory effect or effectiveness of  
5 this method is small.

It is known from Fire, A. et al., NATURE, vol. 391, page 806, that dsRNA, one of whose strands is segmentally complementary to a nematode gene that is to be inhibited, inhibits  
10 expression of this gene very effectively. It is argued that the particular effectiveness of the dsRNA used in the cells of the nematode is not based on the antisense principle, but quite possibly on the catalytic characteristics of the dsRNA. This article makes no claims regarding the effectiveness of  
15 specific dsRNA in relation to the inhibition of gene expression, in human cells in particular.

The task of the present invention is to remove the shortcomings in accordance with the state of the art. In  
20 particular, an effective medicament, and an effective use for the manufacture of a medicament is to be disclosed, with which the inhibition of the expression of a given gene is effected.

This task is solved by the elements in Claims 1, 2, 13, and  
25 14. Advantageous enhancements result from Claims 3 to 12 and 15 to 26.

In accordance with the provisions of the invention, a medicament is anticipated that contains at least one double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) to inhibit the expression  
30 of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least

- segmentally complementary to this gene. Surprisingly, it has been shown that dsRNA is suitable as a medicament to inhibit the expression of a given gene in human cells. Inhibition takes place at a concentration that is at least one order of magnitude lower than occurs using single-stranded oligoribonucleotides. The medicament that is the subject of this invention is highly effective. Lesser negative side effects are to be expected.
- 10 In accordance with further provisions of the invention, a medicament is anticipated that contains at least one vector for coding double-stranded oligoribonucleotides (dsRNA) to inhibit the expression of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.
- 15 The proposed medicament exhibits the above-mentioned advantages. The use of a vector can save on production costs, in particular.

Insofar as dsRNA is used as the active agent, it has been shown to be advantageous for the dsRNA to be present packaged in micellar structures, preferably in liposomes. The dsRNA can also be enclosed in natural viral capsids or capsids that have been synthesized by chemical or enzymatic means, or in structures that have been derived from them. The above-named characteristics make it possible to channel the dsRNA into the given target cells.

In accordance with a further enhancement feature, the dsRNA exhibits 10 to 1000, preferably 252 350, base pairs. Such dsRNA, or vectors that are anticipated to code same, can be synthetically or enzymatically produced using current methods.

The gene to be inhibited, preferentially an oncogene, can be expressible in eukaryotic cells or in pathogenic organisms, preferably in plasmodia. It can be a component of a virus or viroid that is preferably pathogenic in humans. The proposed  
5 medicament permits the treatment of genetically driven diseases, such as cancer and viral diseases.

The virus or viroid can also be one that is pathogenic in animals or plants. In this case, the medicament that is the  
10 subject of this invention permits the treatment of animal or plant diseases.

In accordance with a further enhancement feature, the dsRNA is at least segmentally double-stranded. Their ends can be  
15 modified to prevent degradation in the cell. This can decrease the potential for enzymatic attack.

In accordance with a further provision of the invention, the use of double-stranded oligoribonucleotides to produce a  
20 medicament to inhibit the expression of a given gene is anticipated, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene. Surprisingly, such dsRNA is suitable for the production of a medicament to inhibit the expression of a given gene. In one use of dsRNA,  
25 inhibition occurs at concentrations that are one order of magnitude less than is the case when using single-stranded oligoribonucleotides. The use anticipated in this invention thus makes possible the production of particularly effective medicaments.

30

In accordance with a further provision of the invention, a use of a vector for coding double-stranded oligoribonucleotides

(dsRNA) is anticipated for the production of a medicament to inhibit the expression of the given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene. The use of a vector makes possible the production of 5 particularly inexpensive and effective medicaments.

With regard to the use enhancements, see the description of the aforementioned elements.

10 Example:

An apparent single strand of RNA has been enzymatically synthesized from the only sequence protocol, using established methods.

15

Furthermore, the single strand of RNA that is complementary to it has also been synthesized. Subsequently, the single strand and the complementary single strand are fused into a dsRNA.

The dsRNA created in this way contains a segment of the 20 "immediate early gene" of the cytomegalovirus..

Experimental protocol:

A plasmid vector was constructed, the use of which allowed the necessary dsRNA to be produced. A polymerase chain reaction 25 (PCR) to amplify the 363 base pairs of the 5'-end of the "immediate early gene" of the cytomegalovirus was used to construct this T7/SP6-transcription plasmid. Commercially available "positive control DNA" of the cytomegalovirus from the HeLaScribe Nuclear Extract *in vitro* transcription kit 30 (Promega Co.) was used as the matrix.

Oligodeoxyribonucleotides, whose sequence is identical or complementary to the ends of the above-mentioned region of the

"immediate early genes," served as the primer. The pGEM®-T vector (Promega Co.) was used as the cloning vector for the PCR product that was obtained. Transformation of E. coli XL1-blue ensued. The DNA plasmid of a selected clone, whose  
5 sequence had been checked by partial sequencing, was linearized with NcoI and SalI, respectively, and used as matrices for *in vitro* transcription with SP6-and T7-RNA polymerase, respectively (RiboMAX™ *in vitro* transcription kit, Promega).

10

The oligoribonucleotides obtained were purified and mixed in a sodium phosphate buffer (pH 6.5) in equimolar quantities in the presence of 100mM NaCl. After heating for a short time to 95°C, the mixture was slowly cold down over approximately 2.5  
15 hours, such that formation of dsRNA was achieved by pairing both complementary single strands.

Test system with human nucleus extract:

Transcription efficiency of the given region of the "immediate  
20 early gene" of the cytomegalovirus in the presence of both single-stranded oligoribonucleotides and of dsRNA was determined using the HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* transcription kit (Promega). This was done using the radioactivity incorporated in the "run off" transcripts of the  
25  $[\alpha^{32}\text{P}]$  ATP which is used as the substrate,. Separation of free ATP from the resulting transcription was done using gel electrophoresis. Evaluation of the gel was done with the help of a radioactivity detector (Instant Imager).

30 Results and conclusions:

A clear decrease in the quantity of transcription in the presence of dsRNA was seen in comparison with the control assay without RNA, as well as with the assays with single-stranded RNA. The effectiveness of dsRNA was achieved using  
5 small quantities, in particular less than 10% of that required by antisense technology to inhibit the translation of the required RNA concentration. The inhibitory effect of single-stranded antisense RNA would not have been detectable using this test system, because in this case inhibition takes place  
10 at the level of translation. Transcription was investigated here. The reduction in transcription quantity of a gene in the presence of dsRNA, which was observed in humans here for the first time, clearly demonstrates inhibition of the expression of the corresponding gene. This effect is  
15 attributed to a new type of mechanism conditioned by dsRNA.

## Patent Claims

1. Medicament containing at least one double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) to inhibit the expression of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.

5 2. Medicament containing at least one vector to code double-stranded oligoribonucleotides (dsRNA) to inhibit the expression of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.

10 15 3. Medicament in accordance with Claim 1, whereby the dsRNA is present packaged in micellar structures, preferably in liposomes.

20 4. Medicament in accordance with Claim 1, whereby the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or capsids that have been synthesized by chemical or enzymatic means, or in structures that have been derived from them.

25 5. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the dsRNA exhibits 10 to 1000, preferably 250 to 350, base pairs.

6. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the gene to be inhibited, preferably an oncogene, is expressible in eukaryotic cells.

7. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the gene to be inhibited is expressible in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
- 5    8. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the gene to be inhibited is a component of a virus or viroid.
9. Medicament in accordance with Claim 8, whereby the virus is  
10      a human pathogenic virus or viroid.
10. Medicament in accordance with Claim 8, whereby the virus or viroid is one that is pathogenic in animals or plants.
- 15    11. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the dsRNA is segmentally double-stranded.
12. Medicament in accordance with one of the previous claims, whereby the ends of the dsRNA are modified to prevent  
20      degradation in the cell.
- 25    13. Use of a double-stranded oligoribonucleotide (dsRNA) to produce a medicament that inhibits the expression of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.
14. Use of a vector to code double-stranded oligoribonucleotides (dsRNA) to produce a medicament that inhibits the expression of a given gene, whereby one strand  
30      of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.

15. Use in accordance with Claim 13, whereby the dsRNA is present packaged in micellar structures, preferably in liposomes.

5 16. Use in accordance with Claim 13, whereby the dsRNA is enclosed in natural viral capsids or capsids that have been synthesized by chemical or enzymatic means, or in structures that have been derived from them.

10 17. Use in accordance with one of the Claims 13 to 16, whereby the dsRNA exhibits 10 to 1000, preferably 250 to 350, base pairs.

15 18. Use in accordance with one of the Claims 13 to 17, whereby the gene to be inhibited, preferably an oncogene, is expressible in eukaryotic cells.

20 19. Use in accordance with one of the Claims 13 to 18, whereby the gene to be inhibited is expressible in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

25 20. Use in accordance with one of the Claims 13 to 19, whereby the gene to be inhibited is a component of a virus or viroid.

21. Use in accordance with Claim 20, whereby the virus is a human pathogenic virus or viroid.

22. Use in accordance with Claim 20, whereby the virus or viroid is one that is pathogenic in animals or plants.
23. Use in accordance with one of the Claims 13 to 22, whereby  
5 the dsRNA is segmentally double-stranded.
24. Use in accordance with one of the Claims 13 to 23, whereby the ends of the dsRNA are modified to prevent degradation in the cell.
- 10 25. Use in accordance with one of the Claims 13 to 24, whereby the medicament is injectable into the bloodstream or into the interstitium of the organism being treated.
- 15 26. Use in accordance with one of the Claims 13 to 25, whereby the dsRNA and the vector that codes it, respectively, are taken up by bacteria or microorganisms.

**Summary**

The invention concerns a medicament containing at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to inhibit the  
5 expression of a given gene, whereby one strand of the dsRNA is at least segmentally complementary to this gene.